

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS
NATIVAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN ZONA RURAL
DE MONTERÍA CÓRDOBA**

**JORGE LUIS NEGRETE PEÑATA
LINA MARIA ESQUIVEL AVILA**



**UNIVERSIDAD DE CORDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA CORDOBA
2010**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS
NATIVAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EN ZONA RURAL
DE MONTERÍA CÓRDOBA**

JORGE LUIS NEGRETE PEÑATA

LINA MARIA ESQUIVEL AVILA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para
optar el título de bacteriólogo.**

CECILIA LARA MANTILLA

**Química. M.Sc. Química. Ph.D. Química.
Línea de investigación en Biotecnología.**

(Directora)

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA CORDOBA**

2010

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Montería, Diciembre de 2010

Nota Aclaratoria

El Jurado calificador del trabajo no será responsable de las ideas emitidas por los autores (Artículo 46, Acuerdo 006 de mayo de 1979)

(Consejo Directivo)

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1. MARCO TEÓRICO.....	14
1.1. El suelo.....	14
1.2. Formas de fósforo en el suelo.....	15
1.2.1. Fósforo orgánico.....	15
1.2.2. Fósforo inorgánico.....	16
1.3. Importancia del fósforo y su uso como fertilizante.....	17
1.4. ciclo del fósforo.....	18
1.5. Microorganismos fosfato solubilizadores del suelo.....	19
1.5.1. <i>Burkholderia cepacia</i>	20
1.6. Solubilización de fosfatos	20
1.7. Mineralización de compuestos orgánicos.....	22
1.8. Inmovilización de fosfatos	23
1.9. Oxidación – reducción de fósforo.....	23
1.10. Método para determinar la solubilización de fosfatos.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo General.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. METODOLOGÍA.....	25
3.1. Tipo De Estudio.....	25
3.1.1. Población.....	25
3.1.2. Muestra.....	25
3.2. Aislamiento De Microorganismos Fosfato Solubilizadores.....	25
3.2.1. Fase de campo.....	25
3.2.2. Fase de laboratorio.....	26
3.2.2.1. Determinación De pH De la muestra.....	26

3.2.2.2.	Aislamiento primario de los microorganismos.....	26
3.2.2.3.	Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias.....	27
3.2.2.4.	Conservación de las cepas.....	27
3.3.	Pruebas preliminares.....	27
3.3.1.	Evaluación cualitativa y cuantitativa de solubilización de fósforo.....	28
3.3.2.	Pruebas bioquímicas.....	28
3.4.	Identificación de microorganismos aislados.....	29
3.5.	Ensayos preliminares en semillas de rábano.....	30
3.5.1.	Producción de la bacteria a pequeña escala.....	30
3.5.2.	Ensayo preliminares de los bioinoculantes sobre un cultivo de rábano (Rhapanus sativus).....	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1.	Determinación de pH.....	32
4.2.	Aislamiento primario de los microorganismos.....	33
4.3.	Pruebas preliminares.....	35
4.3.1.	Evaluación cualitativa y cuantitativa de solubilización de fósforo.....	35
4.4.	Identificación de microorganismos fosfato Solubilizadores	38
4.5.	Ensayo preliminar en semillas de rábano.....	38
4.5.1.	Longitud de la planta (cm).....	39
4.5.2.	Longitud de la raíz (cm).....	40
4.5.3.	Peso fresco (mg).....	41
5.	CONCLUSIONES.....	42
6.	RECOMENDACIONES.....	43
7.	BIBLIOGRAFIA.....	44
8.	ANEXOS.....	49

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Elementos químicos esenciales para las plantas.....	14
Tabla 2. Principales formas de fosfato inorgánico.....	16
Tabla 3. Valores de pH de las seis submuestras de suelo.....	32
Tabla 4. Determinación de Índices de solubilización de las cepas seleccionadas.....	36
Tabla 5. Determinación cuantitativa en partes por millón.....	37
Tabla 6. Identificación de microorganismos.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura N° 1: El ciclo del fósforo.....	19
Figura 2. Aislamiento de colonias que presentan actividad fosfato solubilizadoras reflejada en zonas de aclaramiento alrededor de las colonias.	33
Figura 3. Distribución de los microorganismos aislados.....	34
Figura 4. Características microscópicas de las cepas en cada submuestra...	35
Figura 5. Determinación de los índices de solubilización.....	36
Figura 6. Cultivo de rábano tras 8 días de siembra.....	39
Figura 7. Plantas de rábano en los diferentes tratamientos.....	39
Figura 8. Longitud de las plantas por tratamiento.....	40
Figura 9. Longitud de la raíz por tratamiento.....	40
Figura 10. Peso fresco por tratamiento.....	41

Lista de Anexos

	Pag.
Anexo 1: Medio SMRS1.....	49
Anexo 2: Medio NBRIP.....	50
Anexo 3: Vivero de la universidad de Córdoba.....	50

AGRADECIMIENTOS

A Dios, el cual nos brindo la oportunidad de formarnos como profesionales, nos dio fuerzas para seguir avanzando en el largo camino recorrido y nos facilito las herramientas para cumplir con nuestras metas.

A Nuestros padres por darnos la vida, apoyarnos todo el tiempo y animarnos a seguir cuando sentíamos que nuestras fuerzas se agotaban.

A nuestros familiares y amigos por brindarnos su apoyo.

A nuestra directora la Dra. Cecilia Lara Mantilla por brindarnos la oportunidad de realizar este proyecto, acompañarnos en el proceso y permitirnos hacer parte del grupo de investigación en biotecnología GRUBIODEQ.

Al biólogo Jhoan Cardona Doria y la química Mara Villalba por su disposición y colaboración en todos los procesos realizados para el desarrollo de nuestro proyecto.

A la Universidad de Córdoba por abrirnos las puertas para realizar nuestra carrera y a cada uno de los docentes que contribuyeron a nuestra formación profesional como personal.

Jorge Negrete y Lina Esquivel

RESUMEN

El fósforo (P) es un micronutriente mineral esencial para las plantas. Aunque puede encontrarse en los suelos en diferentes formas minerales, su baja solubilidad disminuye la disponibilidad para los vegetales y el nutriente debe aplicarse como fertilizante a los cultivos, aumentando los costos de producción y contaminando el ambiente. Conociendo la importancia del fósforo para el óptimo desarrollo de las plantas y la problemática que envuelve su deficiencia en los cultivos, el objetivo del presente trabajo de investigación fue caracterizar y evaluar microorganismos nativos fosfato solubilizadores a partir de muestras de suelo en el departamento de Córdoba. Se realizó un aislamiento primario en medio SMRS1 en el cual se observó la aparición de halos de solubilización, y una caracterización macroscópica y microscópica de las colonias. En este punto se observó, que la morfología microscópica predominante entre las cepas fueron los bacilos Gramnegativos con un porcentaje del 93%. Se realizó el análisis cualitativo de las cepas aisladas en el medio NBRIP, en esta fase fueron seleccionadas las cepas que presentaran índice de solubilización (IS) mayores de 3 mm. Las cepas finalmente seleccionadas por su capacidad fosfato solubilizadora fueron analizadas mediante el sistema API 20 E y API 20 NE. Las bacterias aisladas correspondieron a: *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea spp*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*. *Burkholderia cepacia* fue el microorganismo con mayor capacidad fosfato solubilizadora y fue utilizado para realizar un pequeño ensayo en semillas de rábano. Se encontró que a una concentración de 10^8 UFC/ml los resultados fueron favorables en el crecimiento y en el peso fresco de la planta.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento vital para el crecimiento de las plantas; está involucrado en varias funciones claves que incluyen transferencia de energía, síntesis de proteínas, fotosíntesis, transformación de azúcares como de almidones, transporte de nutrientes y transferencia de las características genéticas de una generación a la siguiente. El fósforo se clasifica como un nutriente primario, eso significa que los cultivos requieren de él en cantidades relativamente altas; los síntomas visuales de deficiencia se presentan en las hojas maduras. Ningún otro elemento puede sustituir sus funciones en la planta.

El departamento de córdoba, como muchos otros departamento de Colombia, basa gran parte de su economía en el sector agrícola, siendo sus cultivos más importantes coco, sorgo, maíz, arroz, plátano, yuca y algodón. La deficiencia del fósforo en el suelo influye en el tiempo de la cosecha y madurez del desarrollo de la planta, disminuyendo el rendimiento de los cultivos; llevando a la necesidad de recurrir a la implementación de fertilizantes químicos fosforados, hecho que conlleva a la acumulación del fósforo en formas no solubles ni asimilables, debido a que, al adicionarlo al suelo forma complejos con el hierro o con el aluminio. Los agricultores además, se ven en la necesidad de adicionar mayor cantidad de fertilizantes químicos a sus cultivos sin medir las consecuencias que esto tiene para el medio ambiente. Incluso el alto costo de los fertilizantes fosforados, lo cual genera un gran gasto, lo que no resulta rentable para el sector agrícola.

A nivel mundial están surgiendo nuevas tendencias agrícolas, como es el caso de la agricultura sostenible o ecológica con el fin de reemplazar la utilización de agentes químicos por sustancias naturales benéficas para el hombre y el medio ambiente. Entre estas tendencias agrícolas esta la producción de biofertilizantes a base de microorganismos capaces de facilitar mediante

distintos procesos la obtención de los nutrientes necesarios para el desarrollo del cultivo. Por esta razón, es de gran interés el estudio de los microorganismos solubilizadores de fosfato ya que estos desarrollan un papel fundamental en cuanto a la movilización de este elemento, además presentan ventajas en cuanto a los fertilizantes químicos, pues colaboran con la preservación del medio ambiente y no implican sustancias tóxicas que afecten el sistema generando de esta manera una agricultura sostenible. Las bacterias benéficas del suelo juegan un papel importante para las plantas, ya que al asociarse con ellas les permiten, por una parte, aumentar su crecimiento y desarrollo y, por otra, las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades. Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente (pero no necesariamente), con beneficio recíproco para el hospedero (planta) y el simbionte (bacteria).

En este trabajo se caracterizó y evaluó cepas bacterianas nativas solubilizadoras de fosfato, a partir de muestras de suelos de fincas dedicadas a la agricultura en zona rural del municipio de Montería, en el departamento de Córdoba. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de cepas autóctonas con potencial biofertilizante que en el futuro podrán ser utilizadas para mejorar los cultivos en el departamento de Córdoba.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. El suelo

Desde el punto de vista agrícola el término suelo, que deriva del latín *solum* y significa piso, puede definirse como la capa superior de la tierra que se distingue de la roca sólida y en donde las plantas crecen. Con este enfoque, los suelos deben considerarse como formaciones geológicas naturales desarrolladas bajo condiciones muy diversas de clima y materiales de origen, lo cual justifica su continua evolución y, en consecuencia su gran variedad (Navarro, 2003).

En el suelo se encuentran numerosos elementos que son esenciales para el desarrollo de las plantas (tabla1). Todos ellos desempeñan funciones muy importantes en la vida de la planta y cuando están presentes en cantidades insuficientes pueden producir en ella graves alteraciones y reducir notablemente el crecimiento.

Tabla 1. Elementos químicos esenciales para las plantas

NUTRIENTES ESENCIALES PARA LAS PLANTAS			
PARA TODAS		PARA ALGUNAS	
En cantidades relativamente grandes		En cantidades relativamente pequeñas	En cantidades relativamente pequeñas
Extraídos por lo general del aire, en forma de CO ₂ , o del agua del suelo	De los sólidos del suelo	De los sólidos del suelo	De los sólidos del suelo
1. Carbono 2. Hidrogeno 3. Oxigeno	4. Nitrógeno 5. Fósforo 6. Potasio 7. Calcio 8. Magnesio 9. Azufre	10. Hierro 11. Manganeseo 12. Boro 13. Molibdeno 14. Cobre 15. Zinc 16. Cloro	17. Sodio 18. Silicio 19. Cobalto 20. Vanadio

Fuente: Navarro, 2003

En el suelo se desarrollan innumerables formas de vida, de tamaño y actividades muy diversas, que contribuyen a la formación y a la evolución del mismo; se pueden distinguir dos grupos principales los macroorganismos y los microorganismos, y entre los microorganismo se encuentran las bacterias, las cuales desde el punto de vista agrícola constituyen uno de los grupos más importantes, ya que participan en todas las transformaciones orgánicas vitales para el suelo que deba soportar con éxito a las plantas superiores. En este aspecto son fundamentales para la nitrificación, oxidación del azufre, solubilización de fósforo y fijación de nitrógeno atmosférico. Si estos procesos fallan, la vida de las plantas se altera rápidamente (Navarro, 2003).

1.2. Formas de fósforo en el suelo

El fósforo se presenta en la naturaleza como fósforo inorgánico (anión Ortofosfato PO_4^{3-}) y fosforo orgánico. A diferencia del carbono, el nitrógeno, azufre, el fósforo presenta un intercambio de ida y vuelta en la atmósfera muy lento. La mayor parte del fósforo se deposita en las rocas y en el suelo y una vez vertido en el mar el ciclo se aletarga excesivamente. Debido a esto el depósito más grande de fósforo se encuentra en sedimentos marinos (Coyne M., 2000).

1.2.1. Fósforo orgánico

Esta forma de fósforo que ha sido identificada específicamente en el suelo, se encuentra sobre todo, bajo tres formas más o menos degradadas: fosfolípidos, ácidos nucleicos, fitina y derivados. Constituyen, junto a otros compuestos, entre el 20 y 80% del fósforo total del suelo, pero su proporción en la disolución es probablemente pequeña (Navarro, 2003).

El fósforo orgánico proviene de restos vegetales y animales que al ser degradados por los microorganismos del suelo liberan compuestos fosfatados y constituyen del 29 al 65% del fósforo presente en la superficie del suelo

(Arzuaga et al., 2005). Este tipo de fósforo tiende a ser adsorbido sobre las arcillas, por lo cual se podría esperar contenidos superiores de fósforo orgánico en suelos arcillosos que en arenosos o francos.

El fósforo orgánico suele ser mayor en las capas superficiales que en el subsuelo, debido a la acumulación de materia orgánica en la misma y las principales formas de fósforo orgánico son el fosfato de inositol y los ácidos nucleicos los cuales tienen origen principalmente microbiano.

1.2.2. Fósforo inorgánico

El fósforo inorgánico es casi siempre predominante, excepto en los suelos en que la materia orgánica se halla en gran proporción. El fósforo inorgánico del suelo se encuentra principalmente como ortofosfatos. La mayor parte del fósforo normalmente presente en los suelos no es aprovechable por las plantas debido a su gran insolubilidad; para que pueda ser asimilado, es necesario que se encuentre como una de las formas de ortofosfato: PO_4H_2^- o PO_4H^{2-} en la disolución del suelo. La mayor parte del fosforo inorgánico es absorbido en las plantas en forma de PO_4H_2^- y en menor proporción como PO (Navarro; 2003)

Las principales formas de fosfato inorgánico se muestran en la tabla 2. Todas ellas son de menor solubilidad que los compuestos fosfatados orgánicos.

Tabla 2. Principales formas de fosfato inorgánico

	Denominación	Composición	Características
Fosfatos de calcio	hidroxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$	mayor abundancia
	oxiapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ CaO	
	fluorapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ CaF_2	mayor abundancia
	carbonatoapatita	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ CaCO_3	
	fosfato tricálcico	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	

	fosfato bicálcico	CaHPO_4	mayor solubilidad
	fosfato monocalcico	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	mayor solubilidad
Fosfatos de fierro	vivianita	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	estrengita	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Fosfatos de Al	variscita	$\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	

Adaptado de Tsai y Rosetto, 1992

La abundancia relativa de cada uno de estos compuestos variará de acuerdo al origen del suelo, a los niveles de materia orgánica y al pH.

1.3. Importancia del fósforo y su uso como fertilizante

Después del nitrógeno, el fósforo es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Su principal función fisiológica es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Coyne, 2000); el fósforo desempeña un gran papel en la síntesis de proteínas, biosíntesis de lípidos, síntesis de clorofila, compuestos carotenoides, metabolismos de los ácidos orgánicos e interviene en la biogénesis de los glúcidos en la cual aporta energía en forma de ATP o ADP en la reacción de fotosíntesis importante para muchos procesos (Navarro, 2003); sin embargo, el fosforo soluble es un nutriente limitado para producción de biomasa en un ecosistema natural(Hameeda et al, 2006).

Las plantas absorben el fósforo en forma inorgánica, en estado soluble, pero cuando se introduce al suelo, más del 90% de este pasa rápidamente a formas no solubles, no disponibles para los vegetales. De esta manera, gran parte de los fertilizantes fosfatados que se aplican no son utilizados por las plantas, sino que se almacenan en el suelo, debido a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, hierro o aluminio que provoca su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para los vegetales (Fernández et al, 2005).

Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo no están totalmente disponibles para las plantas y la disponibilidad depende del pH del suelo; pueden ser tomados como ion ortofosfato, pero estos pueden convertirse, por bacterias solubilizadoras de fósforo, en fosfatos di y monobásicos, formas asimilables para las raíces de las plantas (Díaz et al, 2001). El pH óptimo para que el ortofosfato sea viable en el suelo es alrededor de 6.5 debido a que la precipitación de los fosfatos de aluminio y calcio disminuye (Sylvia et al. 2005).

Los fertilizantes fosfatados hacen parte de los fertilizantes simples; estos se obtienen a partir de la roca fosfórica (RP); término con el que se conocen al conjunto de minerales naturales que contienen elevada concentración de compuestos fosfatados; la RP es la materia prima principal para la producción de este tipo de fertilizantes (Villanueva y Carrasco, 2001).

1.4. Ciclo del fósforo

El ciclo del fósforo en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas e incluyen fuentes de fósforo en cuatro formas generales: (1) fósforo inorgánico disponible (HPO_4^- y H_2PO_4^-) (2) fósforo orgánico, (3) fósforo adsorbido (lábil) en las arcillas y (4) fósforo como mineral primario (básicamente apatitas) (Hyland et al., 2005) figura N° 1.

El alto contenido de materia orgánica y su rápida descomposición originan una mayor población de microorganismos los cuales para el desarrollo de su ciclo vital retienen temporalmente una cierta cantidad de fósforo. Pero además de esto se puede considerar que algunos compuestos de la degradación orgánica tales como ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, málico, etc.), participan activamente en la formación de complejos con el hierro y el aluminio, con lo que se reduce notablemente la posibilidad de precipitación de los fosfatos inorgánicos.

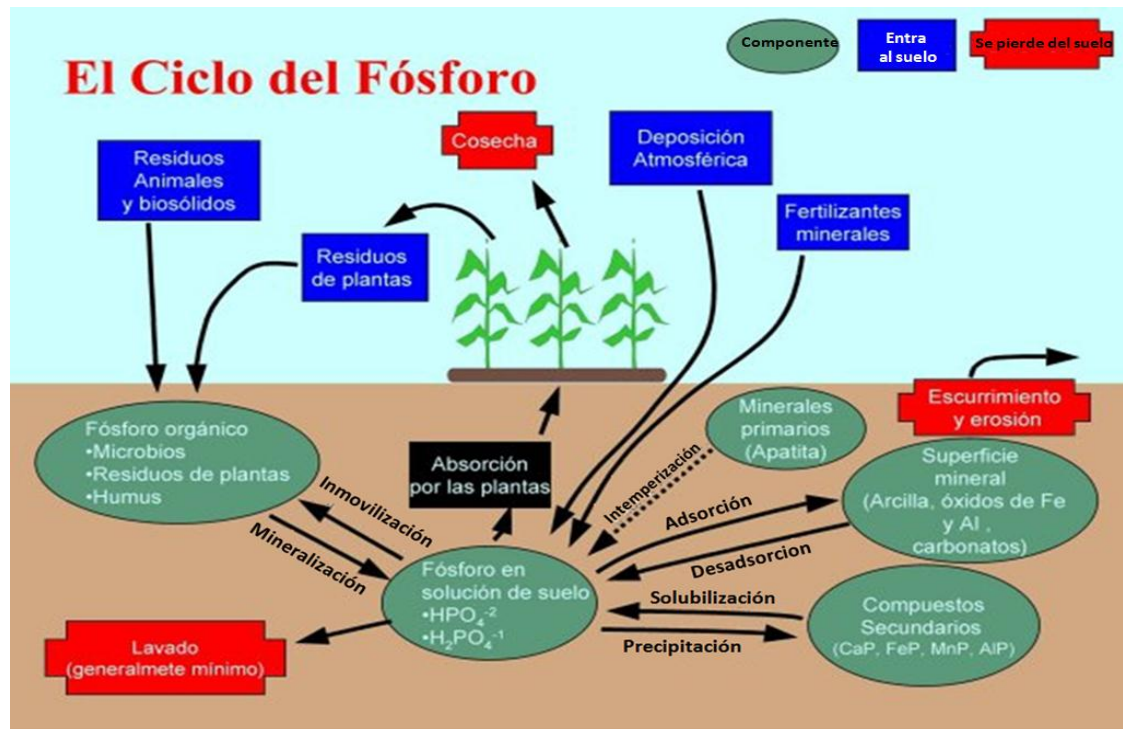


Figura N° 1: El ciclo del fósforo

Fuente: <http://www.inpofos.org>

La actividad microbiana desempeña un papel primordial en la transformación del fósforo en formas solubles y asimilables para las plantas. Los microorganismos participan de manera fundamental en procesos de solubilización, inmovilización y mineralización.

También el fósforo mineral puede presentar transformaciones por la acción de los microorganismos edáficos. Tres procesos pueden presentarse: la transformación de los metafosfatos en ortofosfatos; la reducción de fosfatos a fosfitos, hipofosfitos y fósforos y la solubilización de los fosfatos insolubles, quizás el más importante (Navarro; 2003)

1.5. Microorganismos fosfato solubilizadores del suelo.

Las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo trabajan en conjunto para proveer el fósforo a las plantas y de esta manera asegurar el óptimo crecimiento de las mismas.

Algunos microorganismos solubilizan el fosfato insoluble con procesos como producción de ácidos orgánicos, fosfatasas, quelación e intercambio de reacciones (begonia *et al.*, 2004). Estos procesos no solo compensan los altos costos de fabricación de fertilizantes en la industria, sino que también movilizan los fertilizantes adicionados al suelo (fankem *et al.*, 2006).

Ahora bien, los grupos microbianos capaces de solubilizar el fósforo edáfico son varios y entre ellos se encuentran los hongos, como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Sclerotium*. Un segundo grupo lo constituyen los *Actinomycetes*, grandes productores de sustancias antibióticas y las bacterias entre las que se pueden mencionar a *Bacillus*, *Flavobacterium*, *rizhobium* y *Pseudomonas*.

En Colombia, se han realizados diversos estudios sobre el aislamiento y evaluación de este tipo de microorganismos; sobre bacterias existen datos que demuestran el gran potencial en cuanto a la solubilización de fosfatos, por el contrario, en el caso de los hongos son muy escasos; Useche *et al* (2004) investigo en suelos ácidos amazónicos de bosques poco intervenidos, rastrojos y pastizales la presencia de hongos y bacterias fosfato solubilizadoras, estos investigadores realizaron un gran aporte en cuanto a la identificación de nuevas especies de bacterias fosfato solubilizadoras en Colombia tales como *Pseudomonas spp*, *P.cepacia*, *P.gladioli*, *Xanthomonas spp*, *X.maltophilia*, *Enterobacter agglomerans* ; los hongos con capacidad de solubilizar fosfatos encontrados fueron *Penicilium spp*, *P.implicatum*, *P.citreo-viridae*, *Aspergillus niger*, *A.fumigatus*, *Scopulariosis spp*, *moniliella spp*.

1.5.1. *Burkholderia cepacia*

La producción de sustancias estimuladoras del crecimiento es otra de las propiedades detectadas por las bacterias del género *Burkholderia sp* y dentro de sus principales ventajas se encuentra el estímulo del crecimiento apical, la solubilización del fósforo, la producción de enzimas catalíticas y sustancias estimuladoras de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquinas pero también producen sustancias de otro tipo, como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento (Richardson *et al.*, 2002).

1.6. Solubilización de fosfatos

Los microorganismos tienen la capacidad de llevar los fosfatos insolubles a formas que pueden ser asimilados por las plantas. La solubilización puede generarse por la acción de ácidos grasos orgánicos producidos por las poblaciones microbianas o por quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes; un mecanismo indirecto ocurre cuando los microorganismos asimilan directamente los fosfatos insolubles acumulándose en sus células y liberándolos posteriormente.

El mecanismo de solubilización en los suelos se favorece cuando éstos presentan pH ácidos, con un bajo contenido de calcio y alto contenido de materia orgánica (Guerrero, 1996) además depende también del contenido de fósforo presente en el suelo.

Los compuestos orgánicos fabricados por los microorganismos como el ácido oxálico, pueden quelar el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} desestabilizando así el mineral en cuestión y finalmente solubilizándolo. Las bacterias que solubilizan activamente el fósforo representan un 10 % de la población microbiana del suelo. Se trata fundamentalmente de microorganismos de la rizósfera, como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y algunos hongos (Coyne M., 2000).

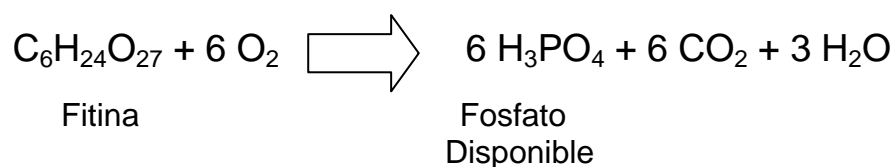
El principal mecanismo utilizado por los microorganismos para solubilizar el fósforo es mediante la producción de ácidos orgánicos, que actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico tales como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica. Los ácidos orgánicos de bajo pesos molecular como el oxálico, cítrico, láctico, succínico, isovalérico, isobutírico y acético, se producen en el suelo como resultado de la descomposición mediada por los microorganismos. Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que la presencia de estos implica un descenso en el pH; valores necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización. La producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de

la glucosa da como resultado la acidificación de las células y sus alrededores (Halder y chakrabartty, 1993).

Se ha investigado que los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones de metales como el Ca^{2+} , Al^{3+} , y Fe^{3+} que están asociados a fósforo insoluble, haciendo que el fósforo quede en forma disponible, reduciendo la adsorción (Rashid et al, 2004). Otro mecanismo por el cual los ácidos orgánicos actúan es por competencia con el fósforo por los sitios de absorción cuando se encuentra en su forma aniónica, aumentando de esta manera la solubilización del fósforo, cambiando las cargas superficiales en los adsorbentes o diluyendo los adsorbentes (Otálora et al, 2003).

1.7. Mineralización de compuestos orgánicos

La mineralización es la conversión microbiana del fósforo orgánico a H_2PO_4 o HPO_4^{2-} (ortofosfato), que son formas de fosforo disponibles para las plantas, El fósforo organico puede ser mineralizado como subproducto de la mineralización de la materia organica del suelo o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y zamuner, 2002). Este proceso esta mediado por las enzimas fosfatasas acidas y alcalinas sintetizadas por los microorganismos y por las raíces de las plantas. Entre los compuestos organicos del fósforo que comúnmente pueden estar presentes en el suelo se encuentran la lecitina, los acidos nucleicos y la fitina los cuales en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno de fácil asimilación para los microorganismos pueden ser degradados por acción de estas enzimas liberando fósforo en forma de fosfatos (Alexander, 1987).



Degradación de Fitina

Fuente: Alexander, 1987

1.8. Inmovilización de fosfatos

La inmovilización se presenta cuando las formas disponibles de fósforo son consumidas por microorganismos, es decir, cuando el fósforo se convierte en fósforo orgánico representado en biomasa, el cual no es disponible.

1.9. Oxidación – reducción de fósforo

Los estados de oxidación del fósforo van desde el -3 (fosfina) hasta el +5 (ortofosfato); esta reacción la realizan los microorganismos los cuales utilizan el fosfito y lo transforman dentro de las células en fosfato; este proceso puede ser inhibido por inhibidores biológicos tales como el tolueno.

La absorción es la unión química del p disponible a las partículas del suelo lo cual hace que el fósforo sea no disponible; la desorción es el proceso de liberación del fósforo adsorbido a las solución del suelo (Hyland et al, 2005).

1.10. Método para determinar la solubilización de fosfatos

Existen dos categorías para clasificar estos métodos. La primera consiste en métodos para la cuantificación de iones ortofosfato, como producto de la solubilización de los compuestos fosfatados y la segunda categoría consiste en métodos para la cuantificación de actividad enzimática de la enzima fosfatasa producida por los microorganismos fosfato solubilizadores. Dentro de los métodos de cuantificación del producto se encuentran el método colorimétrico del ácido vanadomolibdato fosfato, método Mo- Blue, método verde de malaquita. Éste método colorimétrico se basa en que una solución diluida de ortofosfato de molibdato amónico, reacciona en condiciones ácidas para formar ácido molibdofósforico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosforico amarillo: la intensidad de color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato liberado como fósforo soluble. Para la determinación de fosfatos por el método colorimétrico se debe realizar en primer lugar una recta de calibrado con concentraciones conocidas de fosfatos para luego determinar los valores producidos por los microorganismos en estudio (Murphy y Riley, 1962).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Caracterizar y evaluar cepas bacterianas nativas solubilizadoras de fósforo.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Aislar e Identificar cepas bacterianas nativas solubilizadoras de fósforo a partir de muestras de suelos de la región de Córdoba.
- ✓ Evaluar cualitativamente y cuantitativamente la capacidad fosfato solubilizadora de las poblaciones aisladas
- ✓ Realizar un ensayo preliminar en semillas de rábano con la cepa de mayor capacidad fosfato solubilizadora.

3. METODOLOGÍA

3.1. Tipo De Estudio

Se realizó un estudio descriptivo experimental que consta de dos fases, una de campo y una de laboratorio.

3.1.1. Población.

Finca Las Guayabas de la vereda San José de Chocolate, ubicada en el sector rural del municipio de Montería.

3.1.2. Muestra.

Se tomaron 1700 gramos de muestra de suelo compuesta por seis submuestras puntuales obtenida por muestreo aleatorio simple en toda la extensión del cultivo de guayaba (2 hectáreas).

3.2. Aislamiento De Microorganismos Fosfato Solubilizadores

3.2.1. Fase de campo

El muestreo se realizó en el sector rural del municipio de Montería, en la finca Las guayabas ubicada en la vereda San José De Chocolate, parte colindante con el municipio de Cereté, en el sector de los corregimientos Los Garzones y Mateo Gómez, esta región posee las siguientes características:

- Coordenadas geográficas: 8°49' latitud norte y 75°50' longitud oeste
- Altura promedio: 18 msnm (Metros sobre el nivel del mar)
- Precipitación promedio: 1200 – 1300 mm
- Área de cultivo: 2 Hectáreas, que poseen alrededor de 700 árboles de guayaba

- Humedad relativa: 80 – 90 %
- Temperatura promedio: 28°C

Fuente: <http://www.cordoba.gov.co/municipios.html> consultado 20 de junio de 2010.

Se escogieron al azar 18 muestras representativas del suelo del cultivo de guayaba las cuales corresponden a la rizósfera del cultivo, rastrojo, peladero 1, peladero 2, pastos y materia orgánica en descomposición; tres muestras por cada uno de los subgrupos, las cuales se homogenizaron y depositaron en bolsas plásticas selladas.

Fueron almacenadas a temperatura ambiente para el transporte y luego se conservaron bajo condiciones de refrigeración a 4°C, hasta su procesamiento en el laboratorio de GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba Departamento de Química.

3.2.2. Fase de laboratorio

3.2.2.1. Determinación De pH De la muestra

Se realizó la medición de pH a las muestras de suelos obtenidas, utilizando una dilución del suelo y posteriormente se evaluó el pH potenciométricamente con un electrodo de vidrio (E & Q equipos ref. PHM-D).

3.2.2.2. Aislamiento primario de los microorganismos

Se tomaron 4g de cada submuestra previamente homogenizadas y se adicionaron a 36 ml de solución salina (0.85%) con el fin de crear una dilución matriz y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} , tomando 1 ml de la dilución matriz y adicionándola a un tubo de ensayo que contenían 9ml de solución salina (0.85%) para obtener la dilución 10^{-1} , luego se tomó 1 ml de esta dilución transfiriéndose a otro tubo que contenía 9 ml solución salina (0.85%) correspondiendo a una dilución de 10^{-2} ; así sucesivamente hasta preparar diluciones hasta 10^{-5} , todo esto con el fin de aislar los microorganismo de mayor interés. Para aislar la población microbiana

se sembró en medio SMRS1 (Anexo 1) que contenía purpura de bromocresol como indicador de pH, sulfato de amonio y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, cloruro de sodio y potasio para regular la presión osmótica y otros componentes como sulfato de magnesio, sulfato de hierro como cofactores enzimáticos además de incrementar la tasa metabólica de los microorganismos (Otálora et al., 2003). El procedimiento de siembra se realizó por duplicado con el fin de obtener mejores resultados, en cada caja se inocularon 80ul en la superficie del medio, realizando una siembra masiva. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se llevaron a incubar a 27°C de 48 a 72 horas hasta observar crecimiento y presencia de solubilización alrededor de las colonias.

Se seleccionaron las colonias que presentaron halos de solubilización y se realizaron pases celulares en medio SMRS1; Se sembraron por la técnica de agotamiento en placa, las placas se incubaron a 27°C durante 72 horas, con el objetivo de obtener cepas puras.

3.2.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias.

La caracterización macroscópica se realizó teniendo en cuenta características como la forma, color, tamaño y consistencia de las colonias evaluadas. Se identificó la morfología microscópica mediante la realización de la tinción de Gram.

3.2.2.4. Conservación de las cepas

Las cepas aisladas que presentaron la capacidad fosfato solubilizadoras fueron conservadas en caldo nutritivo y en medio SMRS1 líquido a 4°C (GARCIA, María y URUBURU, Federico: conservación de cepas microbianas; colección española de cultivos, Universidad de Valencia - España).

3.3. Pruebas preliminares

Se realizó coloración de Gram de las cepas aisladas para confirmar la morfología microscópica de estas, posteriormente se repicó a medio nutritivo

con el fin de desestresar a los microorganismos ya que estos se encontraban en refrigeración.

3.3.1. Evaluación cualitativa y cuantitativa de solubilización de fósforo

Después de obtener cepas puras se determinó en medio NBRIP (Anexo 2) la capacidad cualitativa de solubilización que presentaban los microorganismos. Las cajas de NBRIP inoculadas con cada una de las cepas puras se incubaron a 28 °C durante 7 días hasta la aparición de halos claros alrededor de las UFC solubilizadoras de fosfato. El tamaño de los halos se calculó con un criterio de selección según el índice de solubilización (IS) (Kumar y Narula; 1999) y se seleccionaron las cepas que mostraban índices de solubilización a partir de 3 mm, las mediciones se realizaron a los 3 y 7 días respectivamente después de la inoculación con el fin de evaluar el comportamiento de las cepas a través de los días.

$$IS = A/B$$

Donde:

A: Diámetro total (Diámetro de la colonia + Diámetro del halo)

B: Diámetro de la colonia

(Kumar y Narula; 1999)

Adicionalmente al estudio cualitativo se llevó a cabo el ensayo cuantitativo, el cual fue realizado por el equipo de investigación del Laboratorio GRUBIODEQ, por triplicado.

3.3.2. Pruebas bioquímicas

Al obtener los microorganismos que presentaron la capacidad fosfato solubilizadora se realizaron repiques a agar nutritivo y luego a medios selectivos dependiendo de los resultados de la coloración de Gram para una identificación preliminar de los respectivos géneros mediante las características fenotípicas y bioquímicas de acuerdo al manual Bergey's.

- Bacilos Gramnegativos: Agar MacConckey, las pruebas bioquímicas indispensables para identificar una posible enterobacteria como son TSI (triple azúcar hierro), SIM (sulfuro, indol, movilidad), Citrato, Urea, LIA (Hierro y lisina agar) y agar Cetrimide para la identificación de *Pseudomonas*.
- Además se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa.

Los ensayos anteriormente mencionados se realizaron por triplicado.

3.4. Identificación de microorganismos aislados

Para la identificación se utilizaron las características macroscópicas de las colonias, complementadas con la observación microscópica utilizando la coloración de Gram. Se realizaron pruebas bioquímicas a los microorganismos aislados, además, se utilizó el kit de identificación API20NE y API2OE (bioMérieux) dependiendo el caso y el programa informático de identificación APIWEBTM.

El sistema de Identificación Multiprueba API consiste en:

API 20NE: Es un sistema estandarizado para la identificación de los bacilos gram negativos no *Enterobacterias* y no fastidiosos (por ejemplo: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otras) que combinan 8 ensayos convencionales, 12 ensayos de asimilación y una base de datos.

API 20E: Es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram negativos no exigentes. Básicamente consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos.

Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20 contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba

bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira, los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina que reconstituye los medios y las reacciones que se producen se ven en el cambio de color.

3.5. Ensayos preliminares en semillas de rábano

3.5.1. Producción de la bacteria a pequeña escala

Luego de aislar e identificar los microorganismos solubilizadores de fosfato, se seleccionó la cepa que mejor resultado demostró cualitativa y cuantitativamente; se sembró masivamente en agar nutritivo y después de 24 horas de incubación se procedió a preparar concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 para las cuales la cepa se inoculó en frascos con 30 ml de caldo nutritivo a temperatura ambiente ($28\pm 2^\circ\text{C}$), manteniendo una agitación constante de 150 rpm en un shaker por un período de 24 horas; con el fin confirmar la concentración celular en cada recipiente se evaluó el crecimiento por el método de diluciones seriadas antes enunciado y sembrando en superficie en agar nutritivo las dos últimas diluciones de cada recipiente se determinó la cantidad de UFC/ml.

Se prepararon diferentes concentraciones del microorganismo que presentó mayor IS: 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC en caldo nutritivo. A éstos preparados se les llamó Bioinoculantes.

3.5.2. Ensayo preliminares de los bioinoculantes sobre semillas de rábano (*Rhapanus sativus*)

Para realizar el experimento se utilizó la semilla comercial “Rábano Crimson Giant Variedad, familia crucíferas”, (Fercon S.A, resolución ICA N°01660). El rábano (*Raphanus sativus*) fue empleado como planta modelo porque presenta un crecimiento rápido, es genéticamente homogéneo, produce cosechas en un tiempo corto y realiza una gran absorción de fósforo del suelo (Hewitson y Price, 1994) El cultivo de rábano se desarrolló en predios de la Universidad de Córdoba, (3 Km. Vía Montería-Cereté), en un vivero (Anexo3), contiguo al

laboratorio GRUBIODEQ , con una temperatura promedio de 29°C y humedad relativa de 79%; el suelo utilizado fue de textura arcillosa (Degiovanni, 2004). No se utilizó ningún tipo de plaguicida.

Las semillas fueron impregnadas con los bioinoculantes durante 60 minutos y se realizaron cuatro tratamientos como son:

Tratamiento 1 (control): Semillas sin ningún tipo de tratamiento.

Tratamiento 2: Semillas tratadas con el microorganismo en la concentración de 10^6 UFC/ml.

Tratamiento 3: Semillas tratadas con el microorganismo en la concentración de 10^7 UFC/ml.

Tratamiento 4: Semillas tratadas con el microorganismo en la concentración de 10^8 UFC/ml.

Posterior al tratamiento aplicado a las semillas, se realizó la siembra de estas en canastas las cuales presentan 30 divisiones cada una, usando media canasta (15 divisiones) para cada tratamiento. Las semillas fueron sembradas a 1 centímetro de profundidad, colocando una semilla en el centro de cada espacio de la canasta, para un total de 30 semillas por caja.

Al finalizar el ensayo preliminar a los 8 días se evaluaron los siguientes parámetros biométricos (Hernández, 2002; Ramírez, 2006):

a) **Longitud de la planta (cm):** Para determinar este parámetro se midió desde la base del tallo hasta la hoja más larga de cada una de las plantas muestreadas.

b) **Longitud de la raíz (cm):** en este parámetro se realizó la medición de la raíz principal de cada planta muestreada.

c) **Peso fresco de la planta (mg):** Para determinar este parámetro se pesó en una balanza analítica cada una de las plantas muestreadas, recién extraídas del suelo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del pH.

Los resultados obtenidos de la medición del pH se exponen en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de pH de las seis submuestras de suelo.

Submuestra	pH
Rastrojo	6.8
Pastos	6.6
Rizósfera de cultivo	7.3
Peladero 1	7.1
Materia Orgánica	7.2
Peladero 2	7.4

Los resultados de pH indicaron valores entre 6.6 – 7.4. Las condiciones en que se encuentra el pH del suelo son determinantes para la solubilización del fósforo ya que la asimilación de este mineral por las plantas sería normal a pH bajos, es decir, cuando la disolución del suelo presentara una acidez notable, debido a que la forma PO_4H^{-2} es la más asimilable. Cuando los suelos presentan pH muy ácidos la solubilidad del aluminio y el hierro es elevada; estos elementos se precipitan con el fósforo en forma de compuestos insolubles, no aprovechables para las plantas; a su vez con un pH alcalino también es limitada la disponibilidad del fosforo por la formación de fosfatos de calcio (apatitas) insolubles.

Lo anterior pone de manifiesto que la mayor disponibilidad de fósforo se da con un pH cercano a la neutralidad (6.5 – 7.5), datos similares a los obtenidos en el estudio realizado por Berrocal, E *et al.*, (2008), quienes analizaron suelos del municipio de Moñitos Córdoba y encontraron valores de pH entre 6.4 - 7.5 en época seca y 6.7 - 7.3 en época lluviosa. Estas condiciones de reacción del suelo permiten inferir una dinámica alta de los fosfatos de calcio apatítico y no-apatítico, que se solubilizan con mayor facilidad en estas condiciones de pH, valores en que también los microorganismos realizan la mayor mineralización del fósforo orgánico (Clavijo, 2001).

4.2. Aislamiento primario de los microorganismos

Para la elección de las cepas de importancia en el proyecto, se tuvo en cuenta la capacidad de solubilización presentada por los microorganismos en el medio SMRS1.

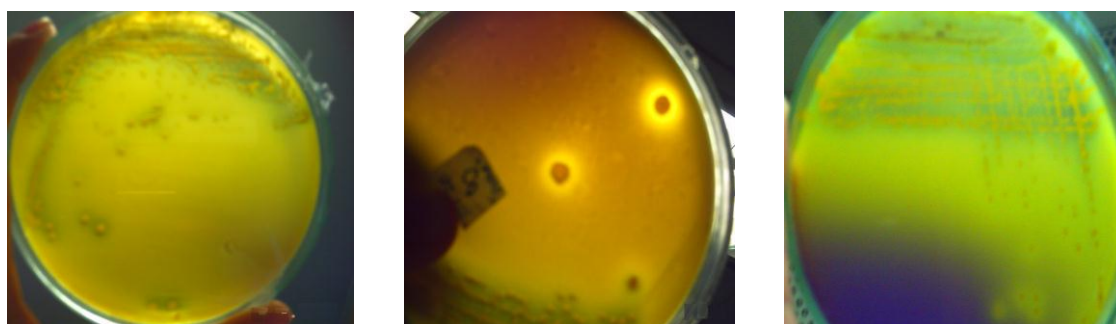


Figura 2. Aislamiento de colonias que presentan actividad fosfato solubilizadoras reflejada en zonas de aclaramiento alrededor de las colonias
Fuente: el autor

Finalizado el proceso de aislamiento de las cepas fosfato solubilizadoras a partir a cada una de las submuestras de los suelos estudiados, se obtuvieron un total de 61 microorganismos.

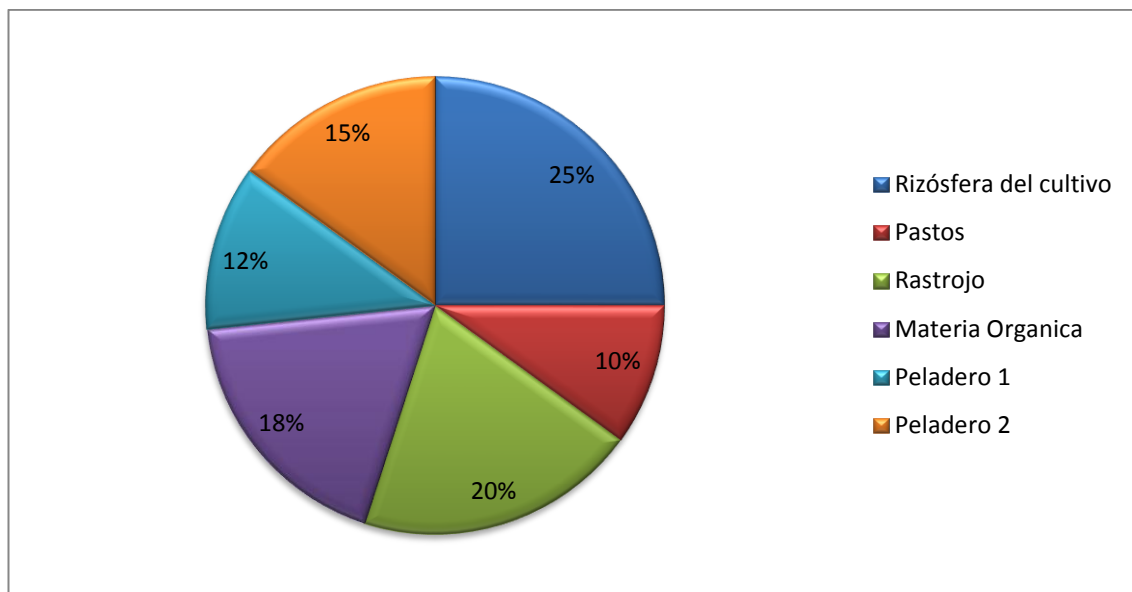


Figura 3. Distribución de los microorganismos aislados.

De acuerdo a la figura anterior se puede evidenciar que la zona donde se encontró mayor número de microorganismos fosfato solubilizadores es la rizósfera del cultivo, lo cual nos ratifica que los microorganismos presentes en las raíces de las plantas, les proporcionan mayor habilidad para obtener los nutrientes indispensables para su desarrollo.

Las bacterias que solubilizan activamente el fósforo representan un 10 % de la población microbiana del suelo. Se trata fundamentalmente de microorganismos de la rizósfera, como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y algunos hongos (Coyne M., 2000).

Dentro de las 61 cepas aisladas por sus características solubilizadoras en las seis submuestras analizadas, se logró evidenciar mediante el uso de la coloración de Gram, que la mayoría son bacilos Gramnegativos, lo cual podemos observar en la figura 4. Esto concuerda con estudios realizados con anterioridad por Bobadilla y rincón (2008); de manera similar por Useche *et al* (2004), el cual realizó estudios en suelos ácidos amazónicos y dentro de las bacterias aisladas en este estudio encontramos *Pseudomonas spp*, *P.cepacea*, *P.gladioli*, *Xanthomonas spp*, *X.maltophilia*, *Enterobacter agglomerans*, todas estas bacilos Gramnegativos.

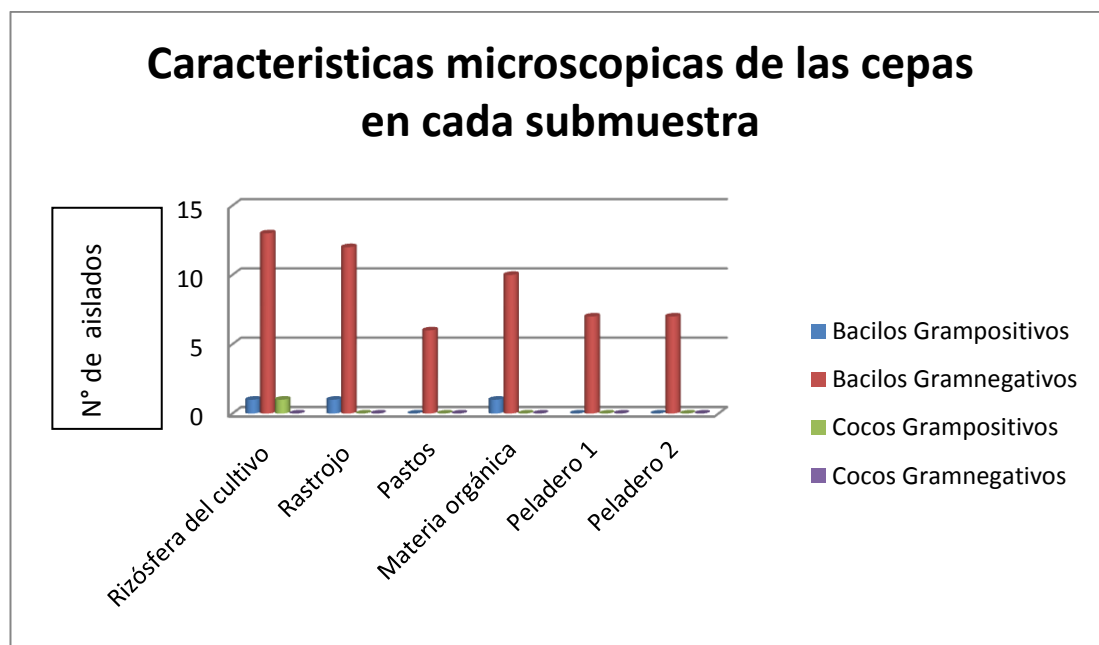


Figura 4. Características microscópicas de las cepas en cada submuestra.

Analizando la grafica anterior, se observa que evidentemente la morfología microscópica predominante fueron los bacilos Gramnegativos en un 93%, seguido de bacilos Grampositivos en un 5% y cocos Grampositivos en un 2%.

4.3. Pruebas preliminares

4.3.1. Evaluación cualitativa y cuantitativa de solubilización de fósforo

Para la evaluación cualitativa de la capacidad fosfato solubilizadora que presentaban las cepas aisladas, se determinaron los halos de solubilización utilizando el medio NBRIP. Los resultados tras la medición de los índices de solubilización, arrojaron valores desde 1.5 hasta 4.2 mm. De esta manera, fueron escogidas finalmente para la continuidad del estudio las cepas con mayores índices de solubilización comprendidos entre 3.0 y 4.2 mm (tabla 4). Los halos de solubilización fueron medidos al tercer día y al séptimo día respectivamente. Se observó que para algunas cepas este intervalo de tiempo era de gran provecho pues el halo total aumentaba de tamaño y el tamaño de la colonia se conservaba, obteniéndose de esta manera buenos índices de

solubilización. Caso contrario ocurría con algunas cepas que se detenían en la formación del halo total y en algunos casos aumentaba el tamaño de la colonia obteniéndose entonces índices de solubilización muy bajos (ver figura 5).

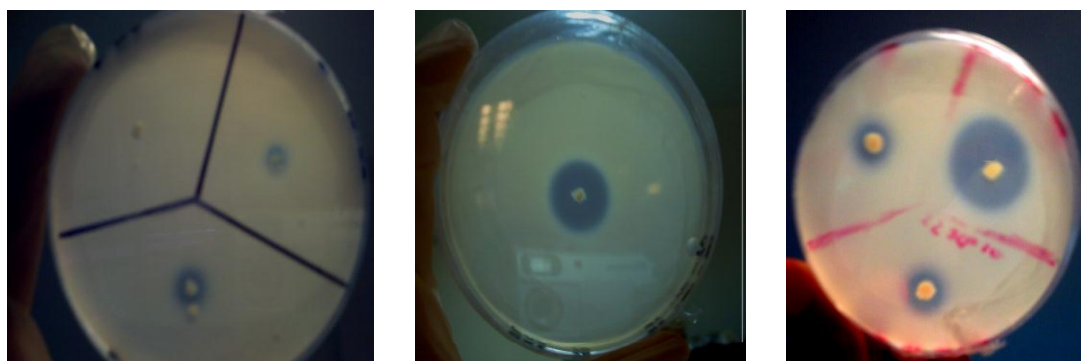


Figura 5. Determinación de los índices de solubilización.

Después de aplicar el criterio de selección obtuvimos 20 cepas con capacidad fosfato solubilizadoras: 5 de rizósfera del cultivo, 8 de rastrojo, 6 de pastos y 1 de materia orgánica con valores comprendidos entre 3.0 y 4.2 mm (Tabla 4) y fueron mayores a los encontrados por Nautiyal (1999). Este autor midió 2 mm de halo en *Bacillus* procedentes de suelos neutros y alcalinos de Lucknow (India).

Tabla 4. Determinación de Índices de solubilización de las cepas seleccionadas

Cepas	3 Días		7 Días	
	D. T.(mm)	IS(mm)	D.T. (mm)	IS(mm)
Riz 3	10	2.0	16	3.2
Riz 5	10	2.0	17	3.4
Riz 9	11	2.7	16	4.0
Riz 11	12	3.0	17	4.2
Riz 15	6	2.0	10	3.3
Ras 2	5	2.5	7	3.5
Ras 3	8	2.6	12	4.0
Ras 4	11	2.7	14	3.5
Ras 8	6	2.0	9	3.0
Ras 10	5	2.5	8	4.0
Ras 11	6	3.0	8	4.0
Ras 12	5	2.5	8	4.0

Ras 13	7	2.3	10	3.3
Pas 1	6	2.0	9	3.0
Pas 2	10	2.5	15	3.7
Pas 3	7	2.3	11	3.6
Pas 4	8	2.0	13	3.2
Pas 5	8	2.6	12	4.0
Pas 6	11	2.7	16	4.0
M O 3	3	1.5	6	3.0

Rastrojo (Ras), Rizósfera del cultivo (Riz), Pastos (Pas), Materia orgánica (M O), Diámetro total del halo (D.T.), Índice de solubilización (IS).

La evaluación cuantitativa de las cepas seleccionadas después de realizar el estudio cualitativo fue llevada a cabo por el equipo de investigación de GRUBIODEQ. Este estudio se realizó con el fin de comprobar la capacidad fosfato solubilizadora en partes por millón (ppm).

Tabla 5. Determinación cuantitativa en partes por millón.

Cepa	Concentración en partes por millón (ppm)	Cepa	Concentración en partes por millón (ppm)
Riz 3	66.12	Ras 11	54.15
Riz 5	67.48	Ras 12	64.76
Riz 9	116.8	Ras 13	38.91
Riz 11	118.8	Pas 1	54.89
Riz 15	105.0	Pas 2	66.12
Ras 2	46.90	Pas 3	74.11
Ras 3	64.25	Pas 4	70.54
Ras 4	36.87	Pas 5	67.14
Ras 8	64.76	Pas 6	64.93
Ras 10	106.28	M O 3	7.14

Rastrojo (Ras), Rizósfera (Riz), Pastos (Pas), Materia orgánica (M O).

La evaluación química de la solubilización de fósforo por los microorganismo mostró valores que van entre 7,14 y 118, 8 ppm, datos que están dentro del rango de solubilización de fosforo reportado por Fernández et al 2005 que

estaban entre 4 – 241ug/ml; de manera similar Kim y Col. (1997), que reportaron valores de 133 µg/ml de fósforo solubilizado.

4.4. Identificación de microorganismos fosfato Solubilizadores

Para el proceso de identificación se seleccionaron dos cepas de cada submuestra, las cuales presentaban las mejores capacidades de solubilizar el fósforo. El proceso de identificación se llevó a cabo utilizando el kit API 20 NE y API 20 E, anterior a la utilización del kit, a los microorganismos se les realizó la caracterización macroscópica y microscópica, pruebas bioquímicas, catalasa y oxidasa, entre las bacterias aisladas encontramos:

Tabla 6. Identificación de microorganismos.

API 20 NE	% ID	API 20 E	% ID
<i>Burkholderia cepacia</i>	98%	<i>Pantoea spp</i>	78%
<i>Pseudomona putida</i>	84%	<i>Enterobacter sakazakii</i>	93%
<i>Aeromona hydrophilia</i>	78%	<i>Enterobacter cloacae</i>	94%
<i>Pseudomona luteola</i>	65%		

El aislamiento de estas bacterias concuerda con estudios realizados por Rivillas O. (2000) quien aisló entre sus microorganismos a *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae*; López et al (2006) quienes aislaron *Burkholderia cepacia* y *Aeromona hidrophyla* a partir de un bioinoculante no comercial utilizado como acondicionador del suelo de un cultivo comercial de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*).

4.5. Ensayo preliminar en semillas de rábano

Transcurrido 8 días después de las siembra de las semillas de rábano (*Raphanus sativus*), se observó crecimiento en todos los tratamientos y se realizó entonces la medición de los parámetros establecidos para este ensayo.



Figura 6. Cultivo de rábano tras 8 días de siembra

4.5.1. **Longitud de la planta (cm):** al final del estudio, se observó incremento en la longitud de las plantas para todos los tratamientos realizados, se evidenció mayor longitud para los tratamientos T2 y T4, y valores intermedios muy similares en T1 Y T3. (ver Figura 8)



Figura 7. Plantas de rábano en los diferentes tratamientos

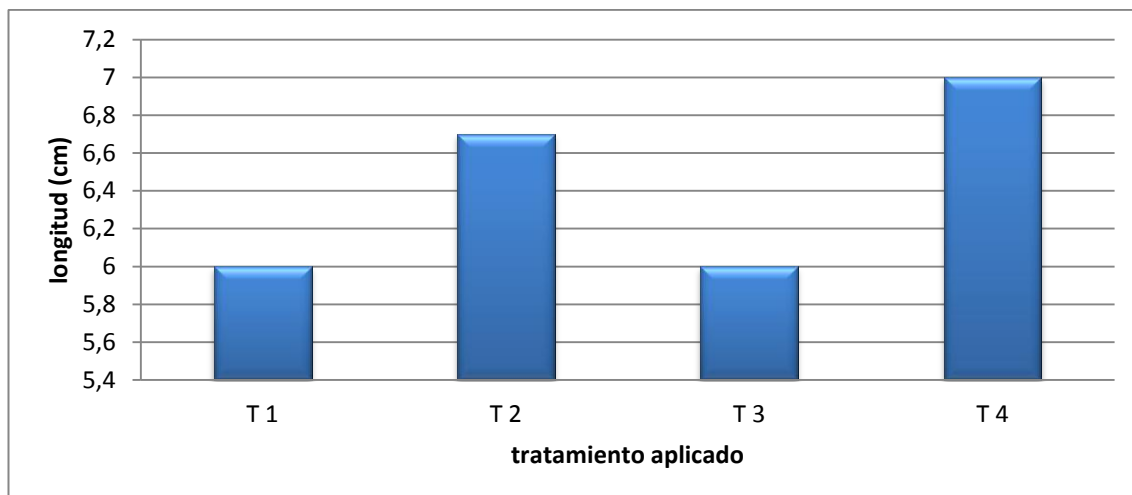


Figura 8. Longitud de las plantas por tratamiento

4.5.2. **Longitud de la raíz (cm):** En este parámetro se observó mayor longitud en la raíz para las plantas de los tratamientos T1 y T2, seguidos por T4 y por último T3.

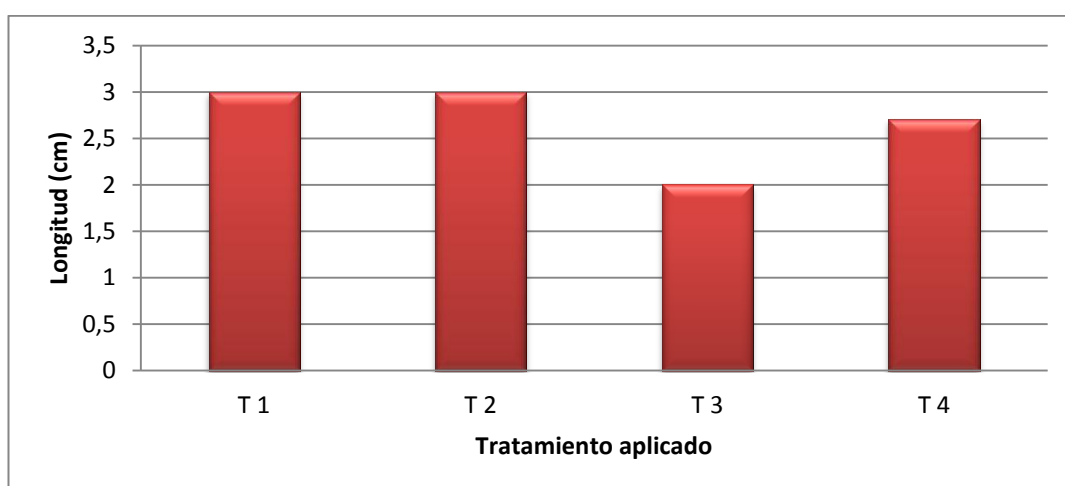


Figura 9. Longitud de la raíz por tratamiento

4.5.3. **Peso fresco (mg):** Para este parámetro se evidenciaron mejores resultados en las plantas de T4 y T2, seguidos por valores relativamente parecidos en T2 y T1.

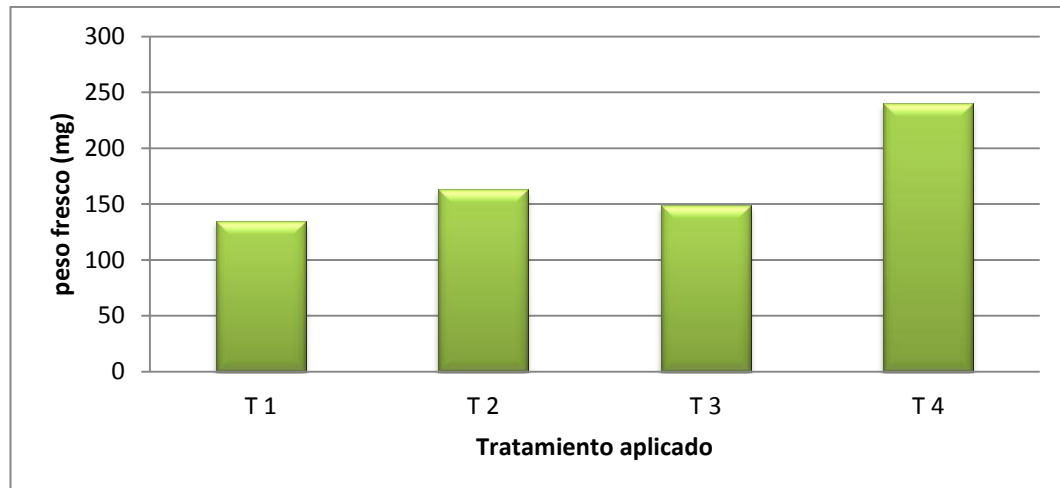


Figura 10. Peso fresco por tratamiento

Los resultados preliminares de este ensayo solo fueron utilizados para evidenciar el comportamiento inicial de las plantas de rábano frente a los diferentes tratamientos utilizando la bacteria solubilizadora de fosfato más representativa; pese a que no se contó con un tiempo adecuado para realizar un estudio más completo debido a las condiciones climatológicas durante el ensayo que se presentaron con lluvias fuertes y repetitivas, los resultados demuestran el efecto benéfico de la bacteria solubilizadora de fosfato.

5. CONCLUSIONES

Según el estudio realizado, la zona donde más se encuentran microorganismos fosfato solubilizadores es la rizósfera del cultivo, ya que fue en esta donde se obtuvo el mayor número de cepas aisladas y se encontraron los mejores índices de solubilización.

La morfología predominante entre los microorganismos fosfato solubilizadores aislados, es la de bacilos Gramnegativos.

Burkholderia cepacia es el microorganismo que presentó mayor índice de solubilización dentro del estudio, y fue aislado de la zona de rizósfera por presentar el mejor IS, calculado en medio sólido y su cuantificación (en ppm) de la capacidad fosfato solubilizadora en medio NBRIP

El ensayo preliminar con semillas de rábano, demostró a los 8 días de cultivo, resultados favorables en el crecimiento de la planta y en el peso fresco de la misma en el tratamiento T 4 (concentración de 10^8 del microorganismo.)

6. RECOMENDACIONES

Luego de concluir el presente trabajo de investigación, se recomienda:

- Evaluar el crecimiento y producción de otros cultivo propios de la región, inoculados con de la bacteria nativa *Burkholderia cepacia*.

7. BIBLIOGRAFIA.

- ALEXANDER, M.1980. Transformaciones microbianas del fósforo (pág. 355 - 371). En: Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, S.A. México. 491 pág.
- ALEXANDER, M.1987. Introduction of soil microbiology. New York. Ed. Wiley and Sons. P 83-88.
- ARZUAGA, S.; FERNANDEZ, C; DALURZO, H; VASQUEZ, S. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen A-O66.
- BEGONIA, M., BEGONIA, G.; MILLER, G.; GILLIARD, D. y YOUNG, C.2004. Phosphatase Activity and Populations of Microorganisms from Cadmium and Lead Contaminated Soil. *Bull. Environ.Contam.Toxicol.* 73:1025-1032
- BERGEY, D. 1957. Bergey's Manual of determinative bacteriology.
- BERROCAL E, 2008, DURANGO J, BARRERA J, PONGUTÁ, B; GRUPO. Evaluación de formas de fósforo en suelos cultivados con plátano. *Agricultura Sostenible, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba*

- CLAVIJO, J; LORA, R; MALAVOLTA, E; Et al; Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo; 2001. Fertilidad de los Suelos, Diagnostico y Control, Editorial Guadalupe LTDA. 2ed Bogotá. Pág. 32
- COYNE M., 2000. Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo. Capítulo 16
- DEGIOVANNI, V., GÓMEZ, J., SIERRA, J. 2004. Análisis de crecimiento y etapas de desarrollo de tres variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en Montería, Córdoba. *Temas Agrarios*. Vol.9. Nº 1. Enero – Junio. p.21-29.
- FANKEM, H.; NWAGA, D.; DEUBEL, A.; DIENG, L.; MERBACH, W Y ETOA, F.X. 2006. Occurence and functioning
- FERNANDEZ, L., ZALBA, P., GÓMEZ, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo* 23(1): 31-37.
- HALDER, A K & PK CHAKRABARTTY. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.
- HAMEEDA, B., HARINI, G RUPELA O., WANI, P., REDDY G. 2006. Growth promotion of maize by phosphate – solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial Research*.
- HERNÁNDEZ, A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacteria asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays* L.). Tesis de doctorado. Universidad de La Habana.
- HEWITSON, J. AND PRICE, R. (1994), Plant mineral nutrition in the classroom, *School Science Review*, 76 (274), 45-55

- HYLAND, C.; KETTERINGS,Q, DEWING,D; STOCKIN,R; CZYMMEK; K.; ALBRECHT.G Y GEOHRING, L 2005. Phosphorus Basics the Phosphorus Cycle. Agronomy Fact Sheet Series: Nutrient Management Spear Program.
- KIM, KY; D JORDAN & HB KRISHNAN. 1997. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol Lett.* 153:273-277
- KUMAR,V y NARULA, N. 1999.Solubilization of organic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum mutans*. *Boil. Fertile. Soils.* Vol 28. Pag 301-305.
- LOPEZ, M; PEREZ, V; MARTINEZ, M & QUEVEDO, B.2006. Evaluacion de un medio de cultivo no comercial para la producción de un biofertilizante empleado en un cultivo de flores. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- MURPHY y RILEY, 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31 - 36.
- NAVARRO, S; NAVARRO, G; 2003. Química Agrícola, Editorial Ediciones mundi-prensa. Madrid España. Págs. 232-250.
- NAUTIYAI, CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:265-270.
- PICONE, L. y ZAMUNER, E. 2002. Fósforo organico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 11-15.

- OTALORA J., PATIÑO L., MARTINEZ M., y PEDROZA, A. 2003. Estandarización de una técnica cualitativa de producción de fosfatasas producidas a través de microorganismos solubilizadores de fosfato. Tesis de pregrado requisito para optar el título de microbiólogo industrial. Facultad de ciencias Pontificia Universidad Bogotá-Colombia
- RAMÍREZ P. R., PÉREZ A. M. 2006. Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*. Vol. 59 N°2. p.3543-3556.
- RASHID, M; KHALIL, S.; AYUB, N; ALAM, S. y LATIF, F. 2004. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) Under *in vitro* Conditions. *Pakistan journal of Biological Sciences* 7(2): 187-196.
- RICHARDSON, J; STEAD, D; ELPHINSTONE, J y COUTTS, R. 2002. Diversity of Burkholderia isolates from woodland rhizosphere environments. *Journal of applied microbiology*. 93:616-630.
- RIVILLAS O., C.A. 2000. Microorganismos del suelo de la zona cafetera colombiana, su diversidad y valor como controladores biológicos. Foro Internacional Café y Biodiversidad. Chinchiná (Colombia)
- SYLVIA D., FUHRMANN J., HARTEL P., Y ZUBERER D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey. Pags. 464-466.

- SUNDARA-RAO, W, SINHA, M. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. Indian J Agric Sci. 33: 272-278.
- USECHE, Y; VALENCIA, H; PÉREZ, H; 2004. Caracterización De Bacterias Y Hongos Solubilizadores De Fosfato Bajo Tres Usos De Suelo En El Sur Del Trapecio Amazónico.
- VILLANUEVA, L.; CARRASCO, M. 2001. Evaluación del impacto de los fertilizantes fosfatados en la acumulación de cadmio en suelos cultivados con maíz (*Zea mays*). Tesis para optar al grado de Magister en Gestión y Planificación Ambiental. Departamento de Postgrado y Postítulo. Programa interfacultades. Universidad de Chile.

8. ANEXOS

Anexo 1

Medio SMRS1

(Sundara- Rao, y Sinha. 1963)

Componente	G/L (Sindra y Raul)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5
KCl	0.2
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.004
NaCl	0.2
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.5
Púrpura de Bromocresol	0.1
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5
Agar	15

Ajustar el pH del medio a 7.2 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.

Anexo 2

Medio NBRIP

(Nautiyal, 1999)

Componente	G/L
Glucosa	10 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
KCl	0,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 g

Anexo 3

Vivero de la universidad de Córdoba

